

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



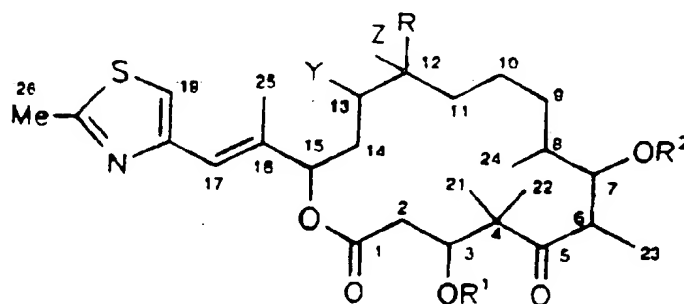
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

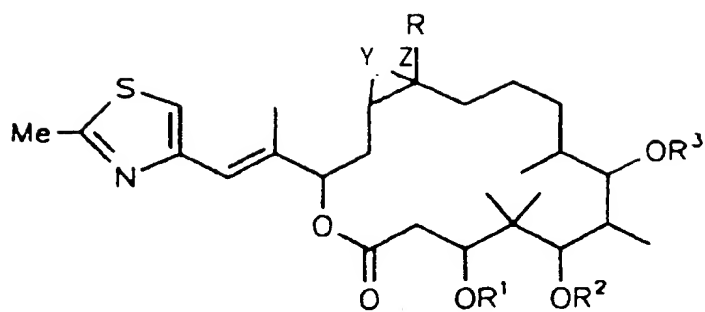
<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07D 493/04, 417/06, 277/24, A61K 31/425, C07F 7/08, C07D 493/08, A01N 43/78, 43/90 // (C07D 493/04, 313:00, 303:00) (C07D 493/08, 321:00, 313:00)</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/19086 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Mai 1997 (29.05.97)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/05080 (22) Internationales Anmeldedatum: 18. November 1996 (18.11.96) (30) Prioritätsdaten: 195 42 986.9 17. November 1995 (17.11.95) DE 196 39 456.2 25. September 1996 (25.09.96) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HÖFLE, Gerhard [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). KIFFE, Michael [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braun- schweig (DE). (74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw.; Boeters & Bauer, Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.</p>	
<p>(54) Title: EPOTHILONE DERIVATIVES, PREPARATION AND USE . (54) Bezeichnung: EPOTHILONDERIVATE, HERSTELLUNG UND VERWENDUNG (57) Abstract The invention relates to epothilone derivatives and the use thereof. (57) Zusammenfassung Die vorliegende Erfindung betrifft Epothilonderivate und deren Verwendung.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

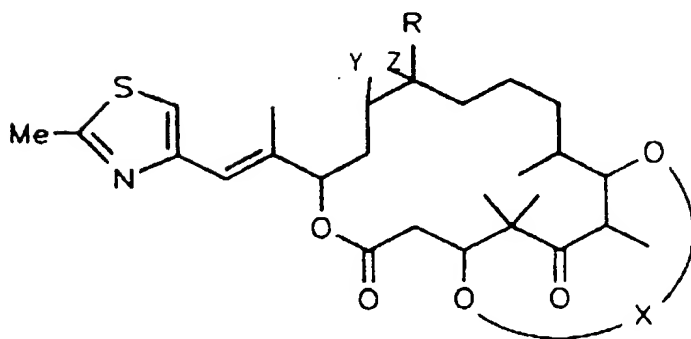
Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LT	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

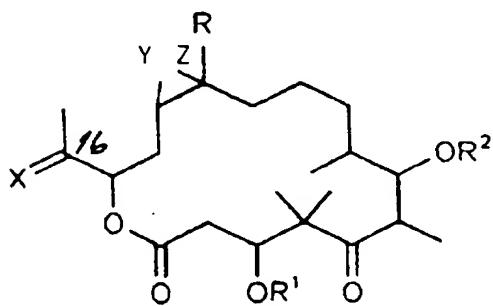




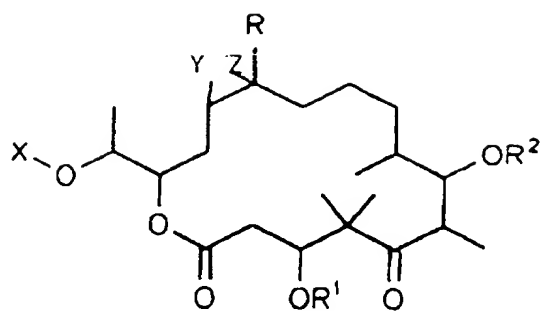
2



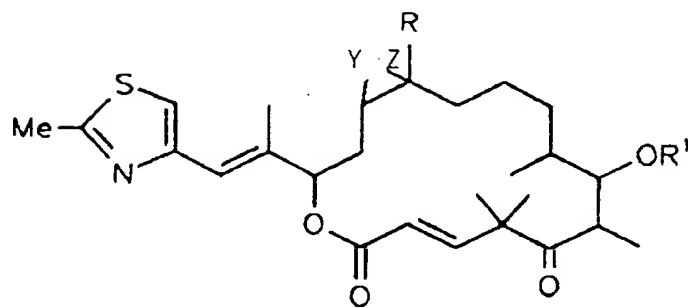
3



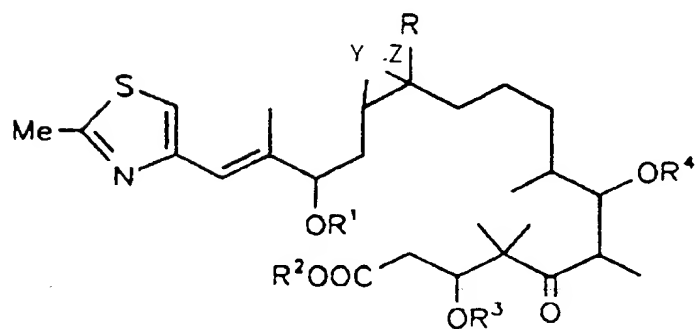
4



5



6



7

In den vorstehenden **Formeln 1 bis Formel 7** bedeuten:

R = H, C₁₋₄-Alkyl;

R¹, R², R³, R⁴, R⁵ = H, C₁₋₆-Alkyl,

C₁₋₆-Acyl-Benzoyl,

C₁₋₄-Trialkylsilyl,

Benzyl,

Phenyl,

C₁₋₆-Alkoxy-,

C₆-Alkyl-, Hydroxy- und Halogen-

substituiertes Benzyl bzw. Phenyl;

wobei auch zwei der Reste R¹ bis R⁵ zu der Gruppierung -(CH₂)_n- mit n = 1 bis 6 zusammentreten können und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt;

Y und Z sind entweder gleich oder verschieden und stehen jeweils für Wasserstoff, Halogen, wie F, Cl, Br oder J, Pseudohalogen, wie -NCO, -NCS oder -N₃, OH, O-(C₁₋₆)-Acyl, O-(C₁₋₆)-Alkyl, O-Benzoyl. Y und Z können auch das O-Atom eines Epoxides sein, wobei Epothilon A und B nicht beansprucht werden, oder eine der C-C-Bindungen einer C=C-Doppelbindung bilden.

In der **Formel 3** steht X allgemein für -C(O)-, -C(S)-, -S(O)-, -CR¹R²-, wobei R¹ und R² die Bedeutung haben wie oben angegeben, und -SiR₂-, wobei R die Bedeutung hat wie oben angegeben.

In der **Formel 4** bedeutet X Sauerstoff, NOR³, N-NR⁴R⁵, und N-NHCONR⁴R⁵, wobei die Reste R³ bis R⁵ die oben angegebene Bedeutung haben.

In der **Formel 5** bedeutet X Wasserstoff, C₁₋₁₈-Alkyl, C₁₋₁₈-Acyl, Benzyl, Benzoyl und Cinnamoyl.

Für Epothilon A und B sei verwiesen auf DE-A-41 38 042.

Verbindungen gemäß der allgemeinen **Formel 1** sind ausgehend von Epothilon A und B sowie von deren 3-O- und/oder 7-O-geschützten Derivaten durch Öffnung des 12,13-Epoxids zugänglich. Werden dazu Hydrogenwasserstoffsäuren in einem bevorzugt nicht wässrigen Lösungsmittel eingesetzt, wobei man die Halogenhydrine $X = \text{Hal}$, $Y = \text{OH}$ und $Y = \text{OH}$, $Y = \text{Hal}$ erhält. Protonensäuren wie z.B. Toluolsulfonsäure und Trifluoressigsäure führen in Gegenwart von Wasser zu 12,13-Diolen, die anschließend nach Standardverfahren acyliert (z.B. mit Carbonsäureanhydriden und Pyridin oder Triethylamin/DMAP) oder alkyliert (Alkylhalogenide und Silberoxid) werden. Die 3- und 7-Hydroxygruppen können dazu vorübergehend als Formiat (Abspaltung mit NH_3/MeOH) oder p-Methoxybenzylether (Abspaltung mit DDQ) geschützt werden.

Verbindungen gemäß der allgemeinen **Formel 2** sind aus Epothilon A und B sowie deren 3-O- und/oder 7-O-geschützten Derivaten durch Reduktion, z.B. mit NaBH_4 in Methanol erhältlich. Sind dabei 3-OH und/oder 7-OH reversibel geschützt, so können nach Acylierung oder Alkylierung und Entfernen der Schutzgruppen 5-O-monosubstituierte, 3,5- oder 5,7-O-disubstituierte Derivate der allgemeinen **Formel 2** erhalten werden.

Umsetzungen von Epothilon A und B mit bifunktionellen elektrophilen Reagenzien, wie (Thio)Phosgen, (Thio)Carbonyldimidazol, Thionylchlorid oder Dialkylsilyldichloriden bzw. -bistriflaten ergeben Verbindungen der allgemeinen **Formel 3**. Als Hilfsbasen dienen dabei Pyridin, Trialkylamine, ggf. zusammen mit DMAP bzw. 2,6-Lutidin in einem nichtprotischen Lösungsmittel. Die 3,7-Acetale der allgemeinen **Formel 3** entstehen durch Umacetalisierung z.B. von Dimethylacetalen in Gegenwart eines sauren Katalysators.

Verbindungen gemäß der allgemeinen **Formel 4** werden aus Epothilon A und B oder ihren 3-O- und/oder 7-O-geschützten Derivaten durch Ozonolyse und reduktive Aufarbeitung, z.B. mit Dimethylsulfid, erhalten. Die C-16-Ketone können anschließend nach dem Fachmann geläufigen Standardverfahren in Oxime, Hydrazone oder Semicarbazone umgewandelt werden. Sie werden weiterhin durch Wittig-, Wittig-Horner-, Julia- oder Petersen-Olefinierung in C-16/C-17-Olefine überführt.

Durch Reduktion der C-16-Ketogruppe, z.B. mit einem Aluminium- oder Borhydrid, sind die 16-Hydroxyderivate gemäß der allgemeinen **Formel 5** erhältlich. Diese können, wenn 3-OH und 7-OH mit entsprechenden Schutzgruppen versehen sind, selektiv acyliert oder alkyliert werden. Die Freisetzung der 3-OH- und 7-OH-Gruppen erfolgt z.B. bei O-Formyl durch NH_3/MeOH , bei O-p-Methoxybenzyl durch DDQ.

Die Verbindungen der allgemeinen **Formel 6** werden aus Derivaten von Epothilon A und B erhalten, bei denen die 7-OH-Gruppe durch Acyl- oder Ethergruppen geschützt ist, in dem die 3-OH-Gruppe z.B. formyliert, mesyliert oder tosyliert und anschließend durch Behandlung mit einer Base z.B. DBU eliminiert wird. Die 7-OH-Gruppe kann wie oben beschrieben freigesetzt werden.

Verbindungen der allgemeinen **Formel 7** werden aus Epothilon A und B oder deren 3-OH- und 7-OH-geschützten Derivaten durch basische Hydrolyse erhalten, z.B. mit NaOH in MeOH oder MeOH/Wasser. Vorzugsweise werden Verbindungen der allgemeinen **Formel 7** aus Epothilon A oder B oder deren 3-OH- oder 7-OH-geschützten Derivaten durch enzymatische Hydrolyse erhalten, insbesondere mit Esterasen oder Lipasen. Die Carboxylgruppe kann mit Diazoalkanen nach Schutz der 19-OH-Gruppe durch Alkylierung in Ester umgewandelt werden.

Ferner können Verbindungen der **Formel 7** durch Lactonisierung nach den Methoden von Yamaguchi (Trichlorbenzoylchlorid/DMAP), Corey (Aldrithiol/Triphenylphosphin) oder Kellogg (omega-Bromsäure/Caesiumcarbonat) in Verbindung der **Formel 2** umgewandelt werden. Einschlägige Arbeitsmethoden finden sich bei

Inanaga et al. in Bull. Chem. Soc. Japan, 52 (1979) 1989; Corey & Nicolaou in J. Am. Chem. Soc., 96 (1974) 5614; und Kruizinga & Kellogg in J. Am. Chem. Soc., 103 (1981) 5183.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen kann man auch von Epothilon C oder D ausgehen, wobei zur Derivatisierung auf die vorstehend beschriebenen Derivatisierungsmethoden verwiesen werden kann. Dabei kann man die 12,13-Doppelbindung selektiv hydrieren, beispielsweise katalytisch oder mit Diimin; oder epoxidieren, beispielsweise mit Dimethyldioxiran oder einer Persäure; oder in die Dihalogenide, Dipseudohalogenide oder Diazide umwandeln.

Die Erfindung betrifft ferner Mittel für den Pflanzenschutz in Landwirtschaft, Forstwirtschaft und/oder Gartenbau, bestehend aus einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilon-derivate bzw. bestehend aus einem oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilonderivate neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

Schließlich betrifft die Erfindung therapeutische Mittel, bestehend aus einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Verbindungen oder einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Verbindungen neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n). Diese Mittel können insbesondere cytotoxische Aktivitäten zeigen und/oder Immunsuppression bewirken und/oder zur Bekämpfung maligner Tumore eingesetzt werden, wobei sie besonders bevorzugt als Cytostatika verwendbar sind.

Die Erfindung wird im folgenden durch die Beschreibung von einigen ausgewählten Ausführungsbeispielen näher erläutert und beschrieben.

Beispiele

Beispiel 1:

Verbindung 1a

20 mg (0.041 mmol) Epothilon A werden in 1 ml Aceton gelöst, mit 50 μ l (0.649 mmol) Trifluoressigsäure versetzt und über Nacht bei 50 °C gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 85 : 15).

Ausbeute: 4 mg (19 %) Isomer I

4 mg (19 %) Isomer II

Isomer I

R_f (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.46

IR (Film): ny = 3440 (m, b, Sch), 2946 (s, Sch), 1734 (vs), 1686 (m), 1456 (m), 1375 (w), 1256 (s, Sch), 1190 (w, b, Sch), 1071 (m, Sch), 884 (w), 735 (w) cm⁻¹.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 493 (43 [M-H₂O]⁺), 394 (47), 306 (32), 206 (30), 181 (40), 166 (72), 139 (100), 113 (19), 71 (19), 57 (24), 43 (24).

Hochauflösung: $C_{26}H_{39}O_6NS$ ber.: 493.2498 für $[M-H_2O]^+$
gef.: 493.2478

Isomer II

R_f (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.22

IR (Film): ν = 3484 (s, b, Sch), 2942 (vs, Sch), 1727
(vs), 1570 (w), 1456 (m), 1380 (m), 1265
(s), 1190 (w), 1069 (m), 975 (w), cm^{-1} .

MS (20/70 eV): m/e (%) = 493 (21 $[M-H_2O]^+$), 394 (12), 306 (46),
206 (37), 181 (63), 166 (99), 139 (100),
113 (21), 71 (23), 57 (33), 43 (28).

Hochauflösung: $C_{26}H_{39}O_6NS$ ber.: 493.2498 für $[M-H_2O]^+$
gef.: 493.2475

Beispiel 2:

Verbindung 1b

55 mg (0.111 mmol) Epothilon A werden in 0.5 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 0.5 ml 1 N Salzsäure versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 1 N Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol, 90 : 10). Ausbeute: 19 mg (32 %)

R_f (Dichlormethan/Methanol, 90 : 10): 0.46

[illegible]

UV (Methanol): λ_{max} (lg epsilon) = 210 (4.29), 248 (4.11) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 529 (13 [M⁺]), 494 (10), 342 (38), 306 (23), 194 (32), 164 (100), 140 (31), 113 (15), 57 (16).

Hochauflösung: $C_{26}H_{40}O_6ClNS$ ber.: 529.2265 für $[M^+]$,
gef.: 529.2280

Beispiel 3:

Verbindung 1c

25 mg (0.047 mmol) 12-Chlor-13-hydroxy-epothilon A (1b) werden in 1 ml Dichlormethan gelöst, mit 29 mg (0.235 mmol) Dimethylaminopyridin, 151 μ l (1.081 mmol) Triethylamin und 20 μ l (0.517 mmol) 98 %-iger Ameisensäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wird mit Eis/Natriumchlorid abgekühlt. Nach Erreichen von -15 °C werden dem Reaktionsgemisch 40 μ l (0.423 mmol) Essigsäureanhydrid zugegeben und 70 Minuten bei -15 °C gerührt. Nachdem ein Dünnschichtchromatogramm keinen vollständigen Umsatz anzeigt, werden dem Reaktionsgemisch weitere 6 mg (0.047 mmol) Dimethylaminopyridin, 7 μ l (0.047 mmol) Triethylamin, 2 μ l 98 %-ige Ameisensäure (0.047 mmol) und 4 μ l (0.047 mmol) Essigsäureanhydrid zugesetzt und 60 Minuten gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt, mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten

organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 90 : 10). Ausbeute: 5 mg (18 %)

R_f (Dichlormethan/Aceton. 90 : 10): 0.67

IR (Film): ny = 3497 (w, b, Sch), 2940 (s, b, Sch), 1725 (vs), 1468 (m, b, Sch), 1379 (m), 1265 (s), 1253 (s), 1175 (vs), 972 (m, b, Sch), 737 (s) cm⁻¹

MS (20/70 eV): m/e (%) = 613 (9 [M⁺]), 567 (43), 472 (63), 382 (23), 352 (21), 164 (100), 151 (33), 96 (31), 69 (17), 44 (26).

Hochauflösung: C₂₉H₄₀O₉NSCl ber.: 613.2112 für [M⁺]
 gef.: 613.2131

Beispiel 4:

Verbindung 1d

10 mg (0.020 mmol) Epothilon B werden in 0.5 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 0.5 ml 1 N Salzsäure versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 85 : 15).

Ausbeute: 1 mg (9 %)

R_f (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.38

MS (20/70 eV): m/e (%) = 543 (3 [M⁺]), 507 (14), 320 (19), 234 (9), 194 (17), 182 (23), 164 (100), 140 (22), 113 (14), 71 (13).

Hochauflösung: C₂₇H₄₂O₆NSCl ber.: 543.2421 für [M⁺]
gef.: 543.2405

Beispiel 5:

Verbindung 2a

100 mg (0.203 mmol) Epothilon A werden in 4 ml Tetrahydrofuran/1 M Phosphatpuffer pH 7 (1 : 1) gelöst und solange mit Natriumborhydrid (150 mg = 3.965 mmol) versetzt bis das Edukt laut Dünnschichtchromatogramm vollständig abreagiert ist. Anschließend wird mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 verdünnt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch Kieselchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 95 : 5 - grad - nach Dichlormethan/Aceton, 85 : 15).

Ausbeute: (20 %)

R_f (Dichlormethan/Aceton, 75 : 25): 0.27

IR (Film): ny = 3413 (s, b, Sch), 2965 (vs, Sch), 1734 (vs), 1458 (m, b, Sch), 1383 (m, Sch), 1264 (s, b, Sch), 1184 (m, b, Sch), 1059 (s, Sch), 966 (s), 885 (w), 737 (m) cm⁻¹

MS (20/70 eV): m/e (%) = 495 (6 [M⁺]), 477 (8), 452 (12), 394 (9), 364 (16), 306 (49), 194 (19), 178 (35), 164 (100), 140 (40), 83 (21), 55 (27).

Hochauflösung: C₂₆H₄₁O₆NS ber.: 495.2655 für [M⁺]
gef.: 495.2623

Beispiel 6:

Verbindung 3a-d (a-d sind Stereoisomere)

100 mg (0.203 mmol) Epothilon werden in 3 ml Pyridin gelöst, mit 50 µl (0.686 mmol) Thionylchlorid versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes und Trennung der vier Stereoisomeren 3a-d erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Toluol/Methanol, 90 : 10).

Verbindung 3a

Ausbeute: 4 mg (12 %)

R_f (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.50

IR (Film): ny = 2961 (m, b, Sch), 1742 (vs), 1701 (vs),
1465 (m, Sch), 1389 (m, Sch), 1238 (s,
Sch), 1210 (vs, Sch), 1011 (s, Sch), 957
(s, b, Sch), 808 (m, Sch), 768 (s, Sch)
cm⁻¹

UV (Methanol): λ_{\max} (lg epsilon) = 210 (4.50), 248 (4.35)
nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (40 [M⁺]), 457 (22), 362 (16), 316
(27), 222 (30), 178 (30), 164 (100), 151
(43), 96 (38), 69 (29), 55 (28), 43 (20).

Hochauflösung: C₂₆H₃₇O₇NS₂ ber.: 539.2011 für [M⁺]

Verbindung 3b

Ausbeute: 14 mg (13 %)

R_f (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.44

IR (Film): ny = 2963 (s, br, Sch), 1740 (vs), 1703 (s),
1510 (w), 1464 (m, br, Sch), 1389 (m,
Sch), 1240 (s, br, Sch), 1142 (m), 1076
(w), 1037 (w), 1003 (m), 945 (s, br,
Sch), 806 (m, Sch), 775 (s), 737 (m) cm⁻¹.

UV (Methanol): λ_{\max} (lg epsilon) = 211 (4.16), 250 (4.08)
nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (27 [M⁺]), 475 (17), 322 (41), 306
(67), 222 (16), 206 (17), 194 (19), 178
(32), 164 (100), 151 (33), 125 (18), 113
(15), 96 (39), 81 (23), 64 (58), 57 (42),
41 (19).

Hochauflösung: C₂₆H₃₇O₇NS₂ ber.: 539.2011 für [M⁺]
gef.: 539.1998

Verbindung 3c

Ausbeute: 4 mg (4 %)

R_f (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.38

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (51 [M⁺]), 322 (22), 306 (53), 222 (36), 178 (31), 164 (100), 151 (41), 96 (25), 81 (20), 69 (26), 55 (25), 41 (25).

Hochauflösung: C₂₆H₃₇O₇NS₂ ber.: 539.2011 für [M⁺]
gef.: 539.2001

Verbindung 3d

Ausbeute: 1 mg (1 %)

R_f (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.33

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (69 [M⁺]), 322 (35), 306 (51), 222 (41), 178 (31), 164 (100), 151 (46), 96 (31), 81 (26), 69 (34), 55 (33), 41 (35)

Hochauflösung: C₂₆H₃₇O₇NS₂ ber.: 539.2011 für [M⁺]
gef.: 539.1997

Beispiel 7:**Verbindung 4a**

10 mg (0.020 mmol) Epothilon A werden in 2 ml Dichlormethan gelöst, auf -70 °C abgekühlt und anschließend 5 Minuten mit Ozon bis zur schwachen Blaufärbung behandelt. Das resultierende Reaktionsgemisch wird anschließend mit 0.5 ml Dimethylsulfid versetzt und auf Raumtemperatur erwärmt. Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch vom Lösungsmittel befreit und schließlich durch

präparative Schichtchromatographie (Laufmittel Dichlormethan/Aceton/Methanol, 85 : 10 : 5) gereinigt.

Ausbeute: 5 mg (64 %)

R_f (Dichlormethan/Aceton/Methanol, 85 : 10 : 5): 0.61

IR (Film): ny = 3468 (s, br, Sch), 2947 (s, br, Sch),
1734 (vs, Sch), 1458 (w), 1380 (w), 1267
(w), 1157 (w), 1080 (w), 982 (w) cm⁻¹.

UV (Methanol): lambda_{max} (lg epsilon) = 202 (3.53) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 398 (2 [M⁺]), 380 (4), 267 (14), 249
(17), 211 (20), 193 (26), 171 (34), 139
(34), 111 (40), 96 (100), 71 (48), 43
(50).

Hochauflösung: C₂₁H₃₄O₇ ber.: 398.2305 für [M⁺]
gef.: 398.2295

Beispiel 8:

Verbindung 6a

10 mg (0.018 mmol) 3,7-Di-O-formyl-epothilon A werden in 1 ml Dichlormethan gelöst, mit 27 µl (0.180 mmol) 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) versetzt und 60 Minuten bei Raumtemperatur gerührt.

Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Natriumdi-hydrogenphosphat-Puffer pH 4.5 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Nach Beseitigung des Lösungsmittel wird das resultierende Rohprodukt in 1 ml Methanol gelöst, mit 200 µl einer ammoniakalischen Methanollösung (2 mmol NH₃/ml Methanol) versetzt und über

Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 4 mg (22 %)

R_f (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.46

IR (Film): ny = 3445 (w, br, Sch), 2950 (vs, br, Sch),
1717 (vs, Sch), 1644 (w), 1466 (m, Sch),
1370 (m, Sch), 1267 (s, br, Sch), 1179
(s, Sch), 984 (s, Sch), 860 (w), 733 (m)
cm⁻¹

UV (Methanol): λ_{max} (lg epsilon) = 210 (4.16) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 475 (28 [M⁺]), 380 (21), 322 (37), 318
(40), 304 (66), 178 (31), 166 (100), 151
(29), 140 (19), 96 (38), 81 (20), 57
(26).

Hochauflösung: C₂₆H₃₇O₅NS ber.: 475.2392 für [M⁺]
gef. 475.2384

Beispiel 9:

Verbindung 6b

50 mg (0.091 mmol) 3,7-Di-O-formyl-epothilon A (werden in 1 ml Dichlorethan gelöst, mit 2 ml (0.013 mol) 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) versetzt und 12 Stunden bei 90 °C gerührt.

Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Natriumdihydrogenphosphat-Puffer pH 4.5 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit.

Die Reinigung des aus zwei Verbindungen bestehenden Rohproduktes erfolgt mittels präparativer Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 90 : 10).

Ausbeute: 7 mg (15 %)

Substanzcode

R_f (Dichlormethan/Aceton, 90 : 10): 0.62

IR (Film): ny = 2951 (m, br, Sch), 1723 (vs), 1644 (w, br, Sch), 1468 (w), 1377 (w), 1271 (m, br, Sch), 1179 (s), 987 (m, br, Sch), 735 (w, br, Sch) cm⁻¹.

UV (Methanol): λ_{max} (lg epsilon) = 210 (4.44) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 503 (68 [M⁺]), 408 (58), 390 (32), 334 (25), 316 (34), 220 (21), 206 (27), 194 (20), 181 (33), 164 (100), 151 (34), 139 (28), 113 (20), 96 (82), 81 (33), 67 (24), 55 (26), 43 (22).

Hochauflösung: C₂₇H₃₇O₆NS ber.: 503.2342 für [M⁺]
gef.: 503.2303

Beispiel 10:

Verbindung 6c

5 mg (0.009 mmol) 3,7-Di-O-acetyl-epothilon werden in 1 ml Methanol gelöst, mit 150 µl einer ammoniakalischen Methanol-lösung (2 mmol NH₃/ml Methanol) versetzt und über Nacht bei 50 °C gerührt.

Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Toluol/Methanol, 90 : 10).

Ausbeute: 3 mg (67 %)

R_f (Dichlormethan/Aceton, 90 : 10): 0.55

IR (Film): ny = 2934 (s, b, Sch), 1719 (vs, b, Sch), 1641 (m), 1460 (m, Sch), 1372 (s, Sch), 1237 (vs, b, Sch), 1179 (s, Sch), 1020 (s), 963 (s, Sch), 737 (vs) cm⁻¹.

UV (Methanol): lambda_{max} (lg epsilon) = 210 (4.33) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 517 (57 [M⁺]), 422 (58), 318 (31), 194 (20), 181 (34), 166 (100), 151 (31), 96 (96), 81 (32), 69 (27), 55 (29), 43 (69).

Hochauflösung: C₂₈H₃₉O₆NS ber.: 517.2498 für [M⁺]
 gef.: 517 2492

Beispiel 11:

Verbindung 7a

20 mg (0.041 mmol) Epothilon werden in 0.5 ml Methanol gelöst, mit 0.5 ml 1 N Natronlauge versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt.

Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol, 85 : 15).

Ausbeute: 11 mg (52 %)

R_f (Dichlormethan/Methanol, 85 : 15): 0.92

IR (Film): ny = 3438 (s, br, Sch), 2971 (vs, br, Sch),
1703 (vs), 1507 (m), 1460 (s, Sch), 1383
(m, Sch), 1254 (w), 1190 (w, br, Sch),
1011 (w, br, Sch), 866 (w, br), 729 (s)
cm⁻¹

MS (20/70 eV): m/e (%) = 423 (0.1 [M⁺]), 323 (4), 168 (89), 140
(100), 85 (31), 57 (67).

Hochauflösung: C₂₃H₃₇O₄NS ber.: 423.2443 für [M⁺]
gef.: 423.2410

Beispiel 12:

Verbindung 7b

5 mg (0.009 mmol) 7-O-Acetyl-epothilon werden in 1 ml Methanol gelöst, mit 200 µl einer ammoniakalischen Methanollösung (2 mmol NH₃/ml Methanol) versetzt und zwei Tage bei 50 °C gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Toluol/Methanol, 90 : 10).

Ausbeute: 3 mg (59 %)

R_f (Dichlormethan/Methanol, 90 : 10): 0.63

IR (Film): ny = 3441 (m, b, Sch), 2946 (s, Sch), 1732
(vs), 1600 (w), 1451 (m), 1375 (m), 1246
(s, b, Sch), 1013 (m, b, Sch) cm⁻¹

UV (Methanol): lambda_{max} (lg epsilon) = 211 (3.75), 247 (3.59)
nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 567 (1 [M⁺]), 465 (4), 422 (7), 388 (5), 194 (5), 182 (7), 168 (65), 164 (17), 140 (100), 97 (10), 71 (22), 43 (27).

Hochauflösung: C₂₉H₄₅O₈NS ber.: 567.2866 für [M⁺]
 gef.: 567.2849

Beispiel 13:

50 mg Epothilon A werden in 20 µl Dimethylsulfoxid angelöst und mit 30 ml Phosphatpuffer (pH 7,1, 30 mM) verdünnt. Nach Zugabe von 5 mg Schweineleberesterase (Fa. Boehringer Mannheim) wird 2 Tage bei 30 °C gerührt. Man säuert mit 2 N HCl auf pH 5 an und extrahiert die Epothilonsäure 7 mit Ethylacetat. Die organische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum zur Trockne eingedampft. Ausbeute 48 mg (96 %).

Beispiel 14:

48 mg Epothilonsäure 7 werden in 6 ml THF abs. gelöst und unter Rühren mit 40 µl Triethylamin und 16 µl 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid versetzt. Nach 15 min wird vom Niederschlag abfiltriert und innerhalb von 15 min unter schnellem Rühren in eine siedende Lösung von 20 mg 4-Dimethylaminopyridin in 200 ml Toluol abs. getropft. Nach weiteren 10 min wird im Vakuum eingedampft und der Rückstand zwischen Ethylacetat/Citratpuffer (pH 4) verteilt. Der Eindampfrückstand der organischen Phase ergibt nach präparativer HPLC Trennung 15 mg Epothilon A.

Beispiel 15:**Epothilone C und D als Ausgangsverbindungen**

A. Produktionsstamm und Kulturbedingungen entsprechend dem Epothilone Basispatent.

B. Produktion mit DSM 6773

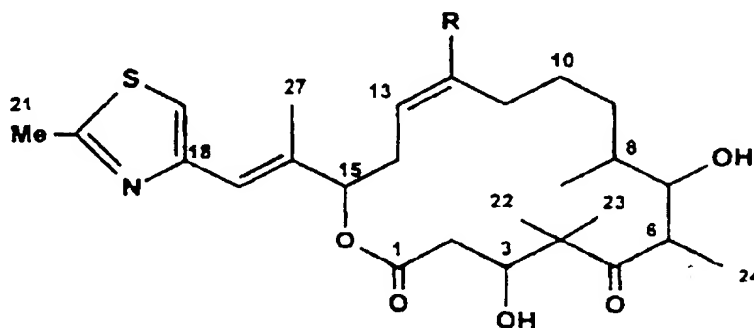
75 l Kultur werden wie im Basispatent beschrieben angezogen und zum Animpfen eines Produktionsfermenters mit 700 l Produktionsmedium aus 0.8 % Stärke, 0.2 % Glukose, 0.2 % Soyamehl, 0.2 % Hefeextrakt, 0.1 % $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 % $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 8 mg/l Fe-EDTA, pH = 7.4 und optional 15 l Adsorberharz Amberlite XAD-16 verwendet. Die Fermentation dauert 7 - 10 Tage bei 30 C, Belüftung mit 2 m³ Luft/h. Durch Regulierung der Drehzahl wird der pO₂ bei 30 % gehalten.

C. Isolierung

Das Adsorberharz wird mit einem 0.7 m², 100 mesh Prozeßfilter von der Kultur abgetrennt und durch Waschen mit 3 Bettvolumen Wasser/Methanol 2:1 von polaren Begleitstoffen befreit. Durch Elution mit 4 Bettvolumen Methanol wird ein Rohextrakt gewonnen, der i. Vak. bis zum Auftreten der Wasserphase eingedampft wird. Diese wird dreimal mit dem gleichen Volumen Ethylacetat extrahiert. Eindampfen der organischen Phase ergibt 240 g Rohextrakt, der zwischen Methanol und Heptan verteilt wird, um lipophile Begleitstoffe abzutrennen. Aus der Methanolphase werden durch Eindampfen i. Vak. 180 g Raffinat gewonnen, das in drei Portionen über Sephadex LH-20 (Säule 20 x 100 cm, 20 ml/min Methanol) fraktioniert wird. Die Epothilone sind in der mit 240 - 300 min Retentionszeit eluierten Fraktion von insgesamt 72 g enthalten. Zur Trennung der Epothilone wird in drei Portionen an Lichrosorb RP-18 (15 µm, Säule 10 x 40 cm, Laufmittel 180 ml/min

Methanol/Wasser 65:35) chromatographiert. Nach Epothilon A und B werden mit $R_t = 90-95$ min Epothilon C und 100-110 min Epothilon D eluiert und nach Eindampfen i. Vak. in einer Ausbeute von jeweils 0.3 g als farblose Öle gewonnen.

D. Physikalische Eigenschaften



Epothilon C $R = H$

Epothilon D $R = CH_3$

Epothilon C

$C_{26}H_{39}NO_5S$ [477]

ESI-MS: (positiv Ionen): 478.5 für $[M+H]^+$

1H und ^{13}C siehe NMR-Tabelle

DC: $R_f = 0,82$

DC-Alufolie 60 F 254 Merck, Laufmittel: Dichlormethan/Methanol = 9:1

Detektion: UV-Löschung bei 254 nm. Ansprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, blau-graue Anfärbung beim Erhitzen auf 120 °C.

HPLC: $R_t = 11,5$ min

Säule: Nucleosil 100 C-18 7 μ m, 125 x 4 mm

Laufmittel: Methanol/Wasser = 65:35

Fluß: 1ml/min

Detection: Diodenarray

Epothilon D

$C_{27}H_{41}NO_5S$ [491]

ESI-MS: (positiv Ionen): 492,5 für $[M+H]^+$

1H und ^{13}C siehe NMR-Tabelle

DC: R_f = 0,82

DC-Alufolie 60 F 254 Merck, Laufmittel: Dichlormethan/Methanol =
9:1

Detektion: UV-Löschung bei 254 nm. Ansprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, blau-graue Anfärbung beim Erhitzen auf 120 °C.

HPLC: R_t = 15,3 min

Säule: Nucleosil 100 C-18 $7\mu m$, 125 x 4 mm

Laufmittel: Methanol/Wasser = 65:35

Fluß: 1ml/min

Detection: Diodenarray

Tabelle: ^1H -und ^{13}C -NMR Daten von Epothilon C und Epothilon D in $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ bei 300 MHz

Epothilon C				Epothilon D			
H-Atom	δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm)	δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm)	
		1	170.3		1	170.1	
2-Ha	2.38	2	38.4	2.35	2	39.0	
2-Hb	2.50	3	71.2	2.38	3	70.8	
3-H	3.97	4	53.1	4.10	4	53.2	
3-OH	5.12	5	217.1	5.08	5	217.4	
6-H	3.07	6	45.4	3.11	6	44.4	
7-H	3.49	7	75.9	3.48	7	75.5	
7-OH	4.46	8	35.4	4.46	8	36.3	
8-H	1.34	9	27.6	1.29	9	29.9	
9-Ha	1.15	10	30.0	1.14	10	25.9	
9-Hb	1.40	11	27.6	1.38	11	31.8*	
10-Ha	1.15*	12	124.6	1.14*	12	138.3	
10-Hb	1.35*	13	133.1	1.35*	13	120.3	
11-Ha	1.90	14	31.1	1.75	14	31.6*	
11-Hb	2.18	15	76.3	2.10	15	76.6	
12-H	5.38**	16	137.3		16	137.2	
13-H	5.44**	17	119.1	5.08	17	119.2	
14-Ha	2.35	18	152.1	2.30	18	152.1	
14-Hb	2.70	19	117.7	2.65	19	117.7	
15-H	5.27	20	164.2	5.29	20	164.3	
17-H	6.50	21	18.8	6.51	21	18.9	
19-H	7.35	22	20.8	7.35	22	19.7	
21-H ₃	2.65	23	22.6	2.65	23	22.5	
22-H ₃	0.94	24	16.7	0.90	24	16.4	
23-H ₃	1.21	25	18.4	1.19	25	18.4	
24-H ₃	1.06	27	14.2	1.07	26	22.9	
25-H ₃	0.90			0.91	27	14.1	
26-H ₃				1.63			
27-H ₃	2.10			2.11			

*, ** Zuordnung vertauschbar

Beispiel 15:**Epothilon A und 12,13-Bisepi-epothilon A aus Epothilon C**

50 mg Epothilon A werden in 1.5 ml Aceton gelöst und mit 1.5 ml einer 0.07 molaren Lösung von Dimethyldioxiran in Aceton versetzt. Nach 6 Stunden Stehen bei Raumtemperatur wird i. Vak. eingedampft und durch präparative HPLC an Kieselgel (Laufmittel: Methyl-tert.butylether/Petrolether/Methanol 33:66:1) getrennt.

Ausbeute:

25 mg Epothilon A, $R_t = 3,5$ min (analyt. HPLC, 7 μ m, Säule 4 x 250 mm, Laufmittel s. o., Fluß 1.5 ml/min)

und

20 mg 12,13-Bisepi-epothilon A, $R_t = 3.7$ min, ESI-MS (pos. Ionen)

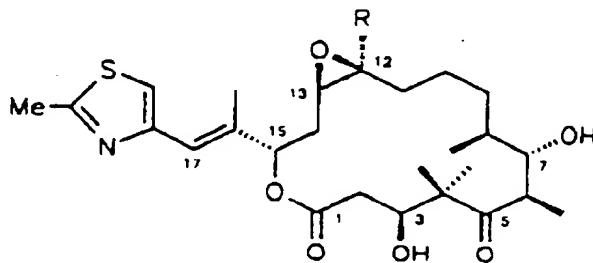
$$m/z = 494 [M+H]^+$$

$^1\text{H-NMR}$ in $[\text{D}_4]$ Methanol, ausgewählte Signale: $\delta = 4.32$

(3-H), 3.79 (7-H), 3.06 (12-H),

3.16 (13-H), 5.54 (15-H), 6.69

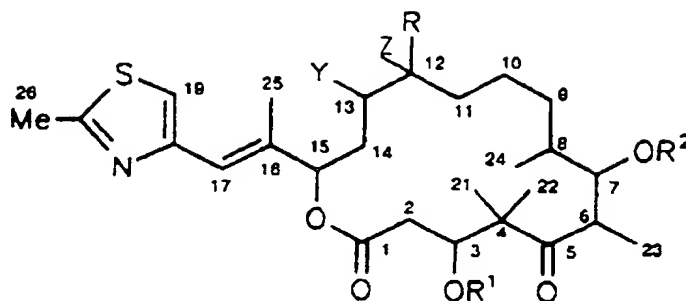
(17-H), 1.20 (22-H), 1.45 (23-H).



12,13-Bisepi-epothilon A $R = \text{H}$

Patentansprüche

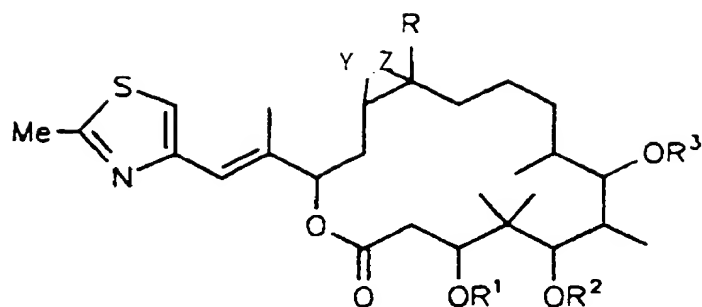
1. Epothilonderivat der Formel 1



1

wobei R = H, C₁₋₄-Alkyl; R¹, R² = H, C₁₋₆-Alkyl, C₁₋₆-Acyl, Benzoyl, C₁₋₄-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C₁₋₆-Alkoxy-, C₆-Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, und Y und Z entweder gleich oder verschieden sind und jeweils für Wasserstoff, Halogen, Pseudohalogen, OH, O-(C₁₋₆)-Acyl, O-(C₁₋₆)-Alkyl oder O-Benzoyl stehen oder gemeinsam das O-Atom eines Epoxids oder eine der C-C-Bindungen einer C=C-Doppelbindung bilden, wobei Epothilon A und B ausgenommen sind.

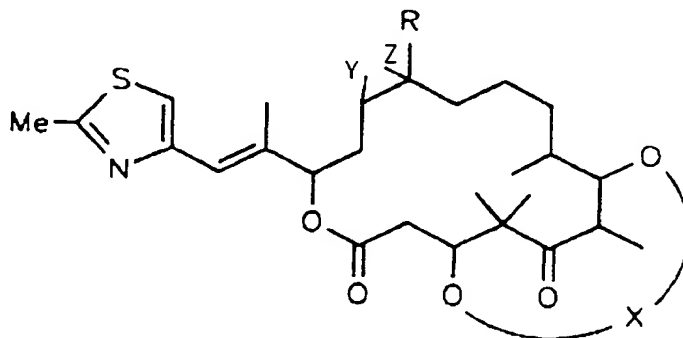
2. Epothilonderivat der Formel 2



2

wobei $R = H, C_{1-4}$ -Alkyl; $R^1, R^2, R^3 = H, C_{1-6}$ -Alkyl, C_{1-6} -Acyl, Benzoyl, C_{1-4} -Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C_{1-6} -Alkoxy-, C_6 -Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt; und Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

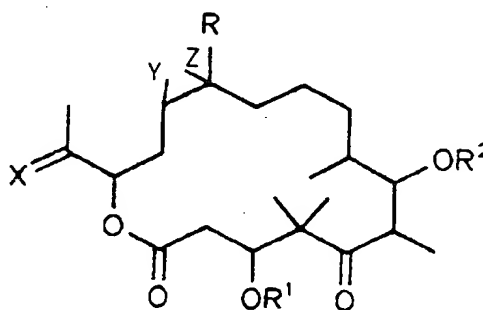
3. Epothilonderivat der Formel 3



3

wobei $R = H, C_{1-4}\text{-Alkyl}$; $R^1, R^2 = H, C_{1-6}\text{-Alkyl}, C_{1-6}\text{-Acyl}, \text{Benzoyl}, C_{1-4}\text{-Trialkylsilyl}, \text{Benzyl}, \text{Phenyl}, C_{1-6}\text{-Alkoxy-}, C_6\text{-Alkyl-}, \text{Hydroxy-}$ und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, und X allgemein für $-C(O)-, -C(S)-, -S(O)-, -CR^1R^2-$ und $-SiR_2-$ steht, wobei R, R^1 und R^2 die Bedeutung haben wie oben angegeben und R^1 und R^2 auch zusammen eine Alkylengruppe mit 2 bis 6 Kohlenstoffatomen bilden können; und Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

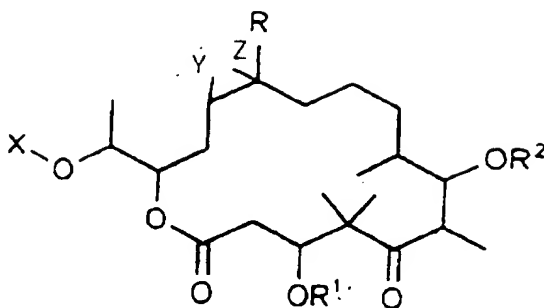
4. Epothilonderivat der Formel 4



4

wobei $R = H, C_{1-4}\text{-Alkyl}$; $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 = H, C_{1-6}\text{-Alkyl}, C_{1-6}\text{-Acyl}, \text{Benzoyl}, C_{1-4}\text{-Trialkylsilyl}, \text{Benzyl}, \text{Phenyl}, C_{1-6}\text{-Alkoxy-}, C_6\text{-Alkyl-}, \text{Hydroxy-}$ und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, X Sauerstoff, NOR^3 , $N-NR^4R^5$, und $N-NHCONR^4R^5$ bedeutet, wobei die Reste R^3 bis R^5 die oben angegebene Bedeutung haben und R^4 und R^5 auch zusammen eine Alkylengruppe mit 2 bis 6 Kohlenstoffatomen bilden können; und Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

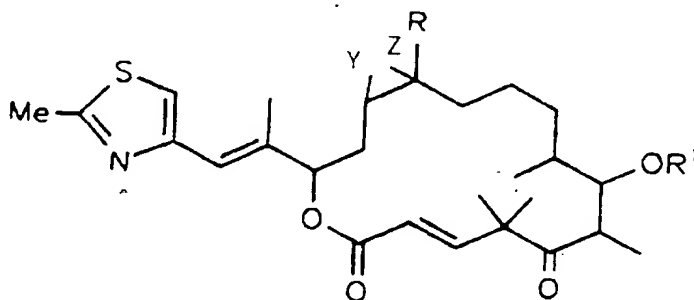
5. Epothilonderivat der Formel 5



5

wobei R = H, C₁₋₄-Alkyl; R¹, R² = H, C₁₋₆-Alkyl, C₁₋₆-Acyl, Benzoyl, C₁₋₄-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C₁₋₆-Alkoxy-, C₆-Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, und X Wasserstoff, C₁₋₁₈-Alkyl, C₁₋₁₈-Acyl, Benzyl, Benzoyl und Cinnamoyl bedeutet und Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

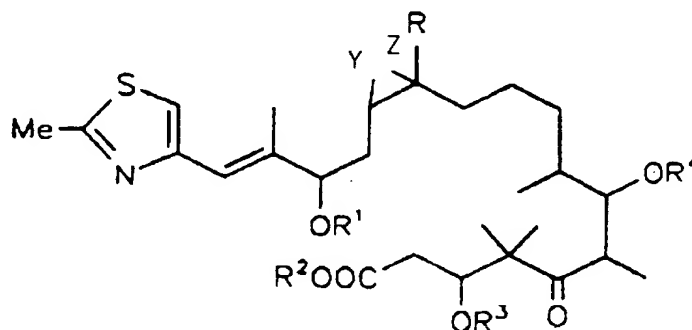
6. Epothilonderivat der Formel 6



6

wobei $R = H$, C_1 - 4 -Alkyl und $R^1 = H$, C_1 - 6 -Alkyl, C_1 - 6 -Acyl, Benzoyl, C_1 - 4 -Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C_1 - 6 -Alkoxy-, C_6 -Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl ist; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt; und Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

7. Epothilonderivat der Formel 7



7

wobei $R = H$, C_1 - 4 -Alkyl und R^1 , R^2 , R^3 , $R^4 = H$, C_1 - 6 -Alkyl, C_1 - 6 -Acyl, Benzoyl, C_1 - 4 -Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C_1 - 6 -Alkoxy-, C_6 -Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt; und Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

8. Verfahren zur Herstellung eines Epothilonderivats der Formel 7 gemäß Anspruch 7, dadurch **gekennzeichnet**, daß man Epothilon A, Epothilon B, ein 3-OH-geschütztes Derivat derselben oder ein 7-OH-geschütztes Derivat derselben

- (a) enzymatisch hydrolysiert, insbesondere mit einer Esterase oder Lipase, oder
- (b) in alkalischem Medium hydrolysiert, insbesondere mit Natriumhydroxid in einem Methanol/Wasser-Gemisch, und das Epothilonderivat der Formel 7 gewinnt und isoliert.

9. Verfahren zur Herstellung eines Epothilonderivats der Formel 2 gemäß Anspruch 2, dadurch **gekennzeichnet**, daß man ein Epothilonderivat der Formel 7 gemäß Anspruch 7 oder als Produkt des Verfahrens gemäß Anspruch 8

- (a) nach der Yamaguchi-Methode oder
 - (b) nach der Corey-Methode oder
 - (c) nach der Kellogg-Methode
- in das Epothilonderivat der Formel 2 umwandelt und dieses Umwandlungsprodukt isoliert.

10. Verfahren zur Herstellung von Epothilon A und/oder 12,13-Bisepi-epothilon A, dadurch **gekennzeichnet**, daß man Epothilon C epoxidiert, insbesondere mit Dimethyldioxiran oder einer Persäure.

11. Verfahren zur Herstellung von Epothilon B und/oder 12,13-Bisepi-epothilon B, dadurch **gekennzeichnet**, daß man Epothilon D epoxidiert, insbesondere mit Dimethyldioxiran oder einer Persäure.

12. Mittel für den Pflanzenschutz in der Landwirtschaft und Forstwirtschaft und/oder im Gartenbau, bestehend aus einem oder mehreren der Verbindungen gemäß einem der vorangehenden Ansprüche oder einer oder mehreren dieser Verbindungen neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

13. Therapeutisches Mittel, insbesondere zum Einsatz als Cytostatikum, bestehend aus einer oder mehrerer der Verbindungen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7 oder einer oder

mehrerer der Verbindungen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7 neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 96/05080

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07D493/04 C07D417/06 C07D277/24 A61K31/425 C07F7/08
C07D493/08 A01N43/78 A01N43/90 //(C07D493/04,313:00,
303:00), (C07D493/08,321:00,313:00)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07D C07F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 93 10121 A (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH)) 27 May 1993 see claims -----	1-13

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 February 1997

Date of mailing of the international search report

13.02.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (-31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (-31-70) 340-3016

Authorized officer

Henry, J

Information on patient family members

PCT/EP 96/05080

Form PCT/ISA:210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/05080

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C07D493/04 C07D417/06 C07D277/24 A61K31/425 C07F7/08
C07D493/08 A01N43/78 A01N43/90 //(C07D493/04,313:00,
303:00), (C07D493/08,321:00,313:00)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07D C07F

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 93 10121 A (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH)) 27.Mai 1993 siehe Ansprüche -----	1-13

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- * "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- * "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- * "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- * "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- * "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

* "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

* "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

* "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

* "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. Februar 1997

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

13. 02. 97

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (- 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (- 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Henry, J

Angaben zu Veröffentlich. : en, die zur selben Patentfamilie gehören

PCT/EP 96/05080

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1992)

THIS PAGE BLANK (USPTO)